

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 53 609.0
Anmeldetag: 15. November 2002
Anmelder/Inhaber: Leica Microsystems Heidelberg GmbH,
Mannheim/DE
Bezeichnung: Scanmikroskop
IPC: G 02 B 21/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 24. Juli 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

Ebert

Scanmikroskop

Die Erfindung betrifft ein Scanmikroskop mit einem in einem Detektionsstrahlengang angeordneten Detektor zum Empfangen von von einer Probe ausgehendem Detektionslicht.

- 5 In der Scanmikroskopie wird eine Probe mit einem Lichtstrahl beleuchtet, um das von der Probe emittierte Detektionslicht, als Reflexions- oder Fluoreszenzlicht, zu beobachten. Der Fokus eines Beleuchtungslichtstrahles wird mit Hilfe einer steuerbaren Strahlablenkeinrichtung, im Allgemeinen durch Verkippen zweier Spiegel, in einer Probenebene bewegt, wobei die
- 10 Ablenkachsen meist senkrecht aufeinander stehen, so daß ein Spiegel in x-, der andere in y-Richtung ablenkt. Die Verkipfung der Spiegel wird beispielsweise mit Hilfe von Galvanometer-Stellelementen bewerkstelligt. Die Leistung des vom Objekt kommenden Detektionslichtes wird in Abhängigkeit von der Position des Abtaststrahles gemessen. Üblicherweise werden die
- 15 Stellelemente mit Sensoren zur Ermittlung der aktuellen Spiegelstellung ausgerüstet.

Speziell in der konfokalen Scanmikroskopie wird ein Objekt mit dem Fokus eines Lichtstrahles in drei Dimensionen abgetastet.

- Ein konfokales Rastermikroskop umfasst im Allgemeinen eine Lichtquelle,
- 20 eine Fokussieroptik, mit der das Licht der Quelle auf eine Lochblende – die sog. Anregungsblende – fokussiert wird, einen Strahlteiler, eine Strahlablenkeinrichtung zur Strahlsteuerung, eine Mikroskopoptik, eine Detektionsblende und die Detektoren zum Nachweis des Detektions- bzw. Fluoreszenzlichtes. Das Beleuchtungslicht wird über einen Strahlteiler
- 25 eingekoppelt. Das vom Objekt kommende Detektionslicht, das beispielsweise

Fluoreszenz- oder Reflexionslicht sein kann, gelangt über die Strahlableinrichtung zurück zum Strahlteiler, passiert diesen, um anschließend auf die Detektionsblende fokussiert zu werden, hinter der sich die Detektoren befinden. Diese Detektionsanordnung wird Descan-Anordnung
5 genannt. Detektionslicht, das nicht direkt aus der Fokusregion stammt, nimmt einen anderen Lichtweg und passiert die Detektionsblende nicht, so daß man eine Punktinformation erhält, die durch sequentielles Abtasten des Objekts mit dem Fokus des Beleuchtungslichtstrahles zu einem dreidimensionalen Bild führt. Meist wird ein dreidimensionales Bild durch schichtweise
10 Bilddatennahme erzielt.

In der konfokalen Scanmikroskopie kann im Falle der Zweiphotonenanregung (oder Mehrphotonenanregung) auf eine Detektionsblende verzichtet werden, da die Anregungswahrscheinlichkeit vom Quadrat der Photonendichte und damit vom Quadrat der Beleuchtungslichtintensität abhängt, die naturgemäß
15 im Fokus viel höher ist als in den Nachbarregionen. Das zu detektierende Fluoreszenzlicht stammt daher mit großer Wahrscheinlichkeit zum aller größten Teil aus der Fokusregion, was eine weitere Differenzierung von Fluoreszenzphotonen aus dem Fokusbereich von Fluoreszenzphotonen aus den Nachbarbereichen mit einer Blendenanordnung überflüssig macht.

Insbesondere vor dem Hintergrund einer ohnehin geringen Ausbeute an Fluoreszenzphotonen bei Zweiphotonenanregung ist eine Non-Descan-Anordnung, bei der das Detektionslicht nicht über die Strahlableinrichtung (Descan-Anordnung) und den Strahlteiler zur Beleuchtungslichteinkopplung zum Detektor gelangt, sondern direkt einem Non-Descan-Detektor zugeleitet
20 wird, interessant, denn im Allgemeinen geht auf diesem Detektionslichtweg weniger Licht verloren. Der Non-Descan-Detektor kann kondensorseitig, also auf der dem Objektiv abgewandten Seite der Probe angeordnet sein. Es ist auch möglich, das objektivseitig von der Probe ausgehende Detektionslicht mit Hilfe eines dichroitischen Strahlteilers von dem Beleuchtungsstrahlengang
25 zu trennen und einem Non-Descan-Detektor zuzuführen. Anordnungen dieser Art sind beispielsweise aus der Veröffentlichung von David. W. Piston et al. „Two-photon-excitation fluorescence imaging of three dimensional calcium-ion
30

activity", Applied Optics, Vol. 33, No. 4, Feb 1996, und aus Piston et al: „Time-Resolved Fluorescence Imaging and Background Rejection by Two-Photon Excitation in Laser Scanning Microscopy", SPIE Vol. 1640 bekannt.

Bei den bekannten Scanmikroskopen wird insbesondere bei Proben, deren
5 Detektionslicht sehr leistungsschwach ist, trotz sorgfältigsten Aufbaus nicht der theoretisch mögliche Kontrast der Abbildung erreicht. Dies ist insbesondere darauf zurückzuführen, dass die Detektoren, insbesondere die in Non-Descan-Anordnung eingesetzten Non-Descan-Detektoren, ständigem Lichteinfall insbesondere an Umgebungslicht ausgesetzt sind. Dies trägt zu
10 einem beschleunigendem Alterungsprozess der Detektoren bei und verursacht insbesondere ungewollte Dunkel- und Untergrundströme und ein schlechtes Rauschverhalten und die Empfindlichkeit der Detektoren ist herabgesetzt.

Eine vorzeitige Alterung oder sogar eine instantane Beschädigung oder
15 Zerstörung von empfindlichen Detektoren wird oft durch zu hohe Detektionslichtleistungen verursacht.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Scanmikroskop vorzuschlagen, bei dem eine vorzeitige Alterung oder eine Zerstörung der Detektoren weitgehend ausgeschlossen ist.

20 Diese Aufgabe wird durch ein Scanmikroskop gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, dass zwischen der Probe und dem Detektor ein optisches Verschlussmittel vorgesehen ist, mit dem der Detektionsstrahlengang blockierbar ist.

Die Erfindung hat den Vorteil, dass die empfindlichen Detektoren,
25 insbesondere in Non-Descan-Anordnung zuverlässig gegen schädigendes und störendes Licht geschützt sind und die Lebensdauer der Detektoren verlängert ist. In ganz besonders vorteilhafter Weise ist die Detektion schwach leuchtender Proben auch mit älteren Detektoren bei guter Abbildungsqualität ermöglicht. Insbesondere empfindliche Halbleiterdetektoren, wie Avalanche-
30 Photodioden, sind bei dem erfindungsgemäßen Scanmikroskop zuverlässig vor einer Strahlung mit zu hoher Lichtleistung geschützt.

Das Verschlussmittel kann sowohl zwischen der Probe und einem Non-Descan-Detektor, als auch zwischen der Probe und einem Descan-Detektor angeordnet sein.

- Vorzugsweise ist ein Steuerungsmittel zur Steuerung des Verschlussmittels vorgesehen. Das Steuerungsmittel kann vorzugsweise automatisch vor dem Beginn eines Scanvorganges den Detektionsstrahlengang durch Öffnen des Verschlussmittels freigeben und ihn am Ende zum Schutz der Detektoren wieder blockieren. Vorzugsweise ist vorgesehen, dass der Detektionsstrahlengang automatisch blockierbar ist, wenn die Lichtleistung des Detektionslichtes eine vorgebbare Schwelle überschreitet. Hierzu ist ein Überwachungsmittel vorgesehen, das die Lichtleistung des Detektionslichtes misst, und im Falle des Überschreitens einer Zerstörschwelle ein Signal an das Steuerungsmittel bzw. direkt an das Verschlussmittel übergibt. Das Überwachungsmittel beinhaltet einen vorzugsweise zerstörresistenten Detektor, der mit aus dem Detektionslichtstrahlengang abgespaltenem Detektionslicht beaufschlagt ist. Vorzugsweise ist das abgespaltene Detektionslicht räumlich aufgeweitet, um hohe Leistungsdichten, die dem Überwachungsmittel schaden könnten, zu vermeiden.

- In einer bevorzugten Variante extrapoliert das Steuerungsmittel den zeitlichen Verlauf der Detektionslichtleistung in die Zukunft und blockiert mit dem Verschlussmittel den Detektionsstrahlengang, wenn eine über einer Schwelle liegende Detektionslichtleistung zu erwarten ist.

- In einer bevorzugten Ausgestaltung ist vorgesehen, dass der Detektionsstrahlengang automatisch blockierbar ist, wenn der Benutzer den Objektrevolver oder ein Strahlteilerfilterrad oder eine andere den Beleuchtungsstrahlengang beeinflussende Manipulation vornimmt. Hierdurch ist vermieden, dass Streu- und Reflexionslicht, das beispielsweise am sich drehenden Objektrevolver entsteht, zu den Detektoren gelangt.

- Vorzugsweise ist das Verschlussmittel derart ausgeführt und beschaltet, dass bei einem Ausfall des Steuerungsmittels oder der Stromversorgung des Scanmikroskops der Detektionsstrahlengang blockiert ist. Diese Ausführung

ist besonders sicher.

Das Verschlussmittel kann einen mechanischen Verschluss oder ein elektrooptisches Element oder ein akustooptisches Element oder ein LCD-Element beinhalten. Die elektrisch angesteuerten Verschlussmittel, wie
5 beispielsweise Akusto-optische-Filter (AOTF; acousto-optical-tunable-filter) oder akustooptische Modulatoren (AOM) oder elektrooptische Modulatoren (EOM) oder LCD-Elemente sind besonders schnell und daher besonders effektiv zum Schutz vor zu hoher Detektionslichtleistung. Der Detektor kann auch eine Photodiode, insbesondere eine Avalanche-Photodiode, oder ein
10 CCD-Element, insbesondere ein EMCCD-Element, oder einen Photomultiplier oder ein Photomultiplierarray umfassen.

Das Scanmikroskop beinhaltet in einer besonderen Ausführungsform einen Multibanddetektor, der mehrere für verschiedene einstellbare Detektionswellenlängenbereiche Detektoren beinhaltet. In dieser
15 Ausführungsform kann das Verschlussmittel zwischen der Probe und dem Multibanddetektor oder vor jedem einzelnen Detektor innerhalb des Multibanddetektors angeordnet sein.

In einer bevorzugten Ausgestaltung ist das Scanmikroskop ein konfokales Scanmikroskop.

20 In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben, wobei gleich wirkende Elemente mit denselben Bezugszeichen versehen sind. Dabei zeigen:

- Fig. 1 ein erfindungsgemäßes Scanmikroskop,
Fig. 2 ein anderes erfindungsgemäßes Scanmikroskop
25 Fig. 3 ein weiteres erfindungsgemäßes Scanmikroskop.

Fig. 1 zeigt schematisch ein erfindungsgemäßes Scanmikroskop. Der von einer Lichtquelle 1, die als Laser 3 ausgeführt ist, kommende Beleuchtungslichtstrahl 5 wird von der Optik 7 auf die Anregungsblende 9
30 fokussiert, um anschließend vom einem Hauptstrahlteiler 11 zur

Strahlableinrichtung 13, die einen kardanisch aufgehängten Spiegel 15 beinhaltet, reflektiert zu werden. Die Strahlableinrichtung 13 führt den Beleuchtungslichtstrahl 5 durch die Scanoptik 17, die Tubusoptik 19, den Strahlteiler 21 und das Objektiv 23 über bzw. durch die Probe 25. Der

5 Strahlteiler 21 dient bei der Non-Descan-Detektion zur Auskopplung des von der Probe ausgehenden Detektionslichtes 27. Der Strahlteiler 21 weist eine dichroitische Beschichtung auf, die den Beleuchtungslichtstrahl 5 passieren lässt, das in der Wellenlänge verschobene Detektionslicht jedoch zum Non-Descan-Detektor 29 reflektiert. Das Detektionslicht 27 gelangt bei Descan-

10 Detektion über die Strahlableinrichtung 13 zurück zum Strahlteiler 11, passiert diesen und die Detektionsblende 31 und trifft anschließend auf den Descan-Detektor 33. Zur Descan-Detektion wird der Strahlteiler 21 vorzugsweise aus dem Detektionsstrahlengang entfernt. Die Beschichtung kann jedoch auch so ausgelegt sein, dass Detektionslicht 27, das

15 beispielsweise durch Zweiphotonenanregung entstand, zum Non-Descan-Detektor 29 reflektiert wird und Detektionslicht aus Einphotonenanregung den Strahlteiler 21 ungehindert passiert, um zum Descan-Detektor 33 zu gelangen. Vor dem Non-Descan-Detektor 29 ist ein Verschlussmittel 37 und vor dem Descan-Detektor 33 ist ein weiteres Verschlussmittel 35 angeordnet.

20 Die Verschlussmittel 37, 35 sind als akustooptische Filter (AOTF) aufgeführt, die von einem Steuerungsmittel 39, das als elektronische Schaltung ausgeführt ist, gesteuert sind. Der Detektionsstrahlengang wird durch das Steuerungsmittel automatisch vor dem Beginn eines Scanvorganges freigeben und am Ende des Scanvorganges blockiert. Mit einem weiteren

25 Strahlteiler 41 wird ein kleiner Teil des Detektionslichtes 27 zu einem Überwachungsmittel 43, das als Photodiode ausgeführt ist, geleitet, das die Lichtleistung des Detektionslichtes misst und in Form eines Messsignals an das Steuerungsmittel 39 übergibt. Der Detektionsstrahlengang wird von dem Steuerungsmittel 39 automatisch blockiert, wenn die Lichtleistung des

30 Detektionslichtes eine vorgegebene Schwelle überschreitet.

Fig. 2 zeigt ein weiteres erfindungsgemäßes Scanmikroskop, das dem in Fig. 1 gezeigten Scanmikroskop ähnelt, jedoch mit durchlichtseitiger Non-Descan-

- Detektion. Das Detektionslicht 27 wird von einem Kondensor 45 zu einem Detektionslichtstrahl gebündelt und von einem Spiegel 47 zu dem Non-Descan-Detektor 29 gelenkt, vor dem sich ein Verschlussmittel 37, das als eine von einem Magneten bediente Schranke ausgeführt ist, angeordnet ist.
- 5 Das Verschlussmittel 37 ist von einem Steuerungsmittel 39 automatisch gesteuert.

- Fig. 3 zeigt schematisch ein weiteres erfindungsgemäßes Scanmikroskop. Der von der Lichtquelle 1 emittierte Beleuchtungslichtstrahl 5 beleuchtet durch den Strahlteiler 21 und das Objektiv 23 hindurch die Probe 25. Das von der Probe
- 10 25 ausgehende Detektionslicht 27 wird von dem Strahlteiler 21 zu dem Detektor 49, der als Avalanche-Photodiode 51 ausgeführt ist, geführt. Vor dem Detektor 49 ist ein Verschlussmittel 37 positioniert, das von einem Steuerungsmittel 39 automatisch gesteuert ist. Das Verschlussmittel 37 blockiert den Detektionsstrahlengang bevor die Detektionslichtleistung eine
- 15 Zerstörschwelle erreicht und außerhalb der Bildaufnahmezeiten. Im Strahlengang des Beleuchtungslichtstrahles 5 ist zur Sicherheit ein weiteres Verschlussmittel 53 vorgesehen, das ebenfalls von dem Steuerungsmittel 39 bedient ist.

- Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform
- 20 beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.

Bezugszeichenliste:

	1	Lichtquelle
	3	Laser
5	5	Beleuchtungslichtstrahl
	7	Optik
	9	Anregungsblende
	11	Hauptstrahlteiler
	13	Strahlableinrichtung
10	15	Spiegel
	17	Scanoptik
	19	Tubusoptik
	21	Strahlteiler
	23	Objektiv
15	25	Probe
	27	Detektionslicht
	29	Non-Descan-Detektor
	31	Detektionsblende
	33	Descan-Detektor
20	35	weiteres Verschlussmittel
	37	Verschlussmittel
	39	Steuerungsmittel
	41	Strahlteiler
	43	Überwachungsmittel
25	45	Kondensor

47	Spiegel
49	Detektor
51	Photodiode
53	weiteres Verschlussmittel

Patentansprüche

1. Scanmikroskop mit einem in einem Detektionsstrahlengang angeordneten Detektor zum Empfangen von von einer Probe ausgehendem Detektionslicht, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen der Probe und dem Detektor ein optisches Verschlussmittel vorgesehen ist, mit dem der Detektionsstrahlengang blockierbar ist.
2. Scanmikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Detektor ein Non-Descan-Detektor ist.
3. Scanmikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Detektor ein Descan-Detektor ist.
4. Scanmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass ein Steuerungsmittel zur Steuerung des Verschlussmittels vorgesehen ist.
5. Scanmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass der Detektionsstrahlengang automatisch vor dem Beginn eines Scanvorganges freigebbar und am Ende des Scanvorganges blockierbar ist.
6. Scanmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Detektionsstrahlengang automatisch blockierbar ist, wenn die Lichtleistung des Detektionslichtes eine vorgebbare Schwelle überschreitet.
7. Scanmikroskop nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass ein Überwachungsmittel vorgesehen ist, das die Lichtleistung des Detektionslichtes misst.
8. Scanmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Verschlussmittel einen mechanischen Verschluss oder ein elektrooptisches Element oder ein akustooptisches Element oder ein LCD-Element beinhaltet.

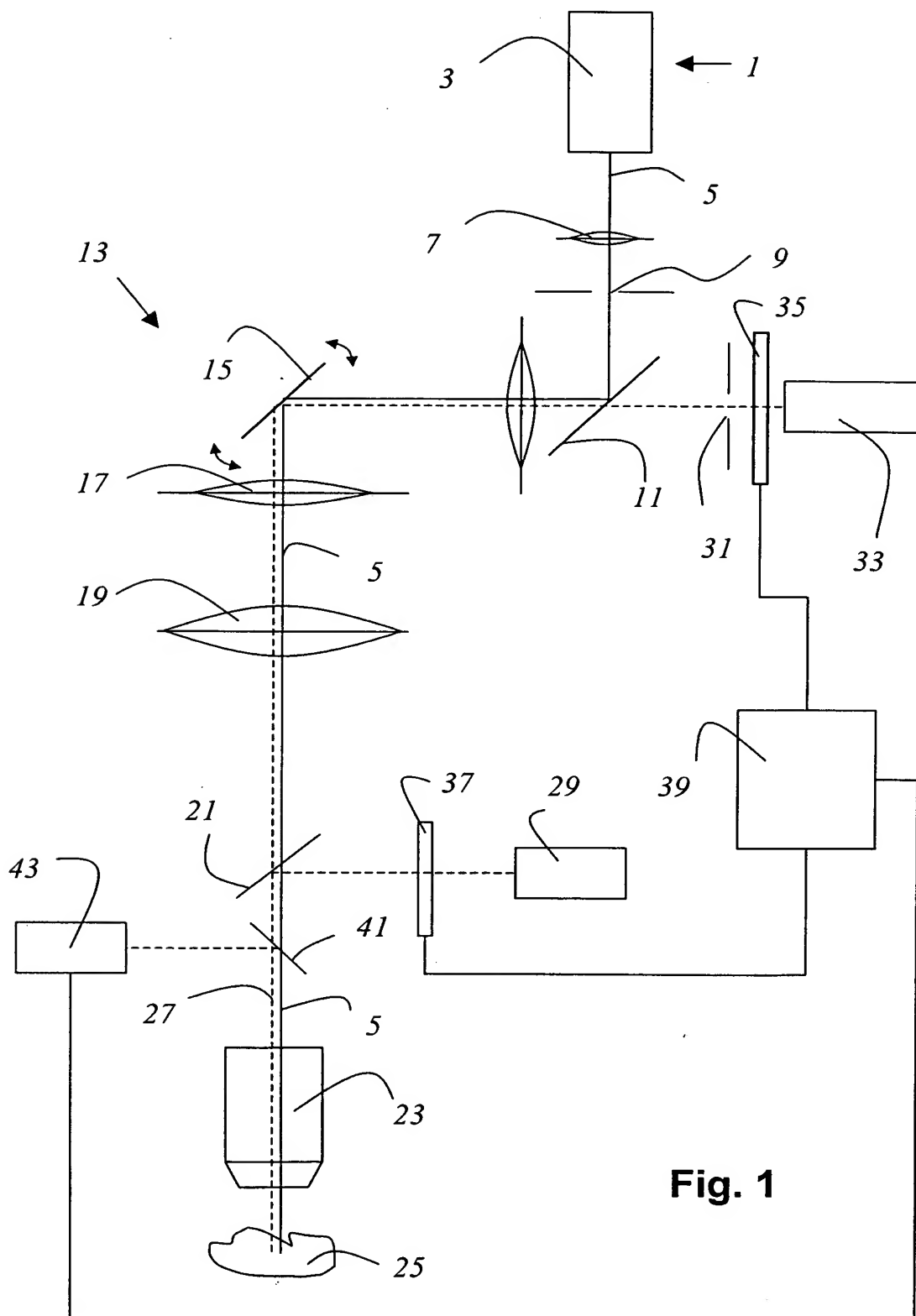
9. Scanmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Detektor eine Photodiode, insbesondere eine Avalanche-Photodiode, oder ein CCD-Element, insbesondere ein EMCCD-Element, oder einen Photomultiplier oder ein Photomultiplierarray beinhaltet.
- 5 10. Scanmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Scanmikroskop ein konfokales Scanmikroskop ist.

Zusammenfassung

- Ein Scanmikroskop mit einem in einem Detektionsstrahlengang angeordneten Detektor zum Empfangen von von einer Probe ausgehendem Detektionslicht weist zwischen der Probe und dem Detektor ein optisches Verschlussmittel auf, mit dem der Detektionsstrahlengang blockierbar ist. Es ist ein Steuerungsmittel zur Steuerung des Verschlussmittels vorgesehen. Der Detektionslichtstrahlengang ist automatisch außerhalb des Scanvorganges und bei zu hoher Detektionslichtleistung blockierbar.
- 5

10

Fig. 1



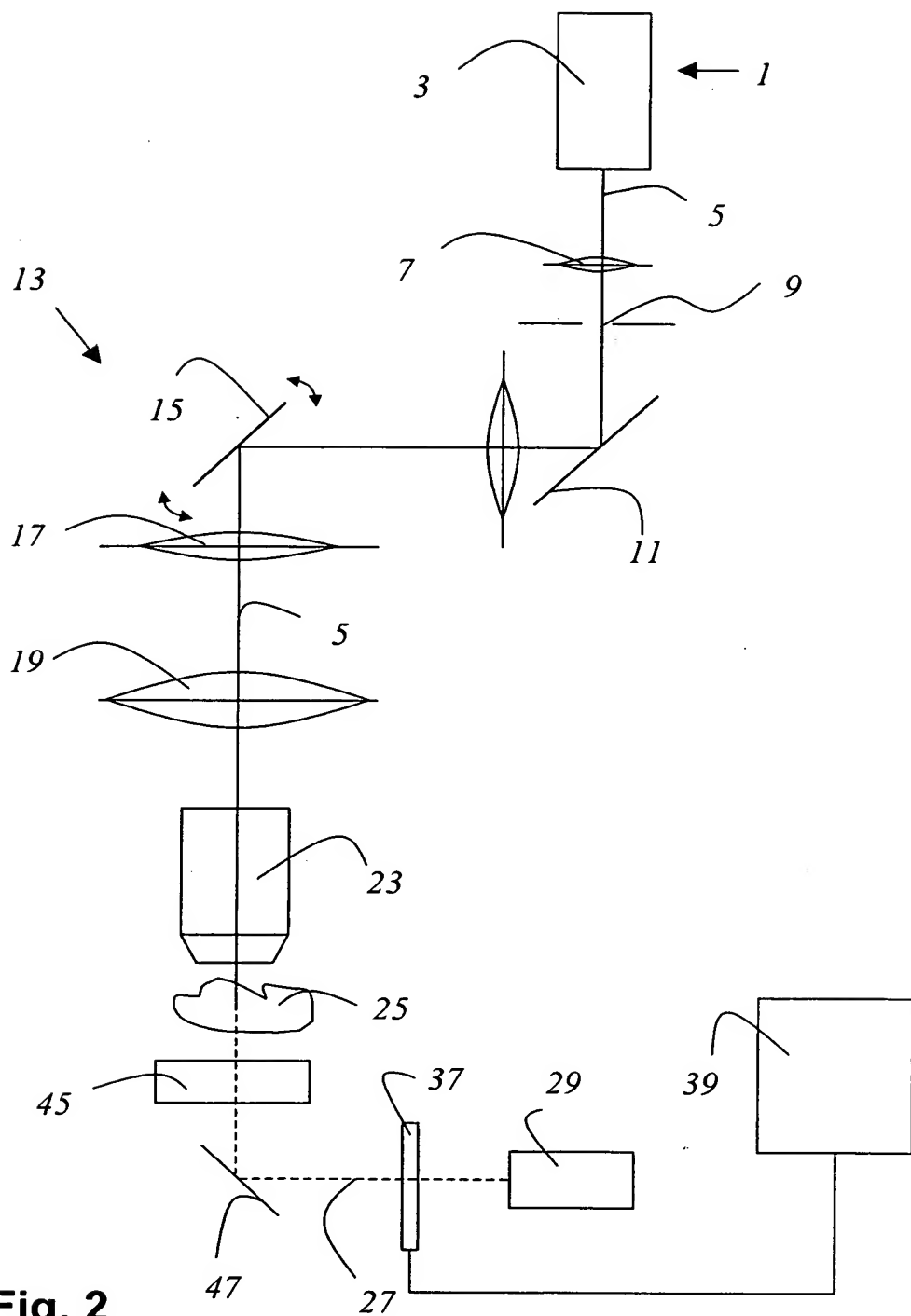


Fig. 2

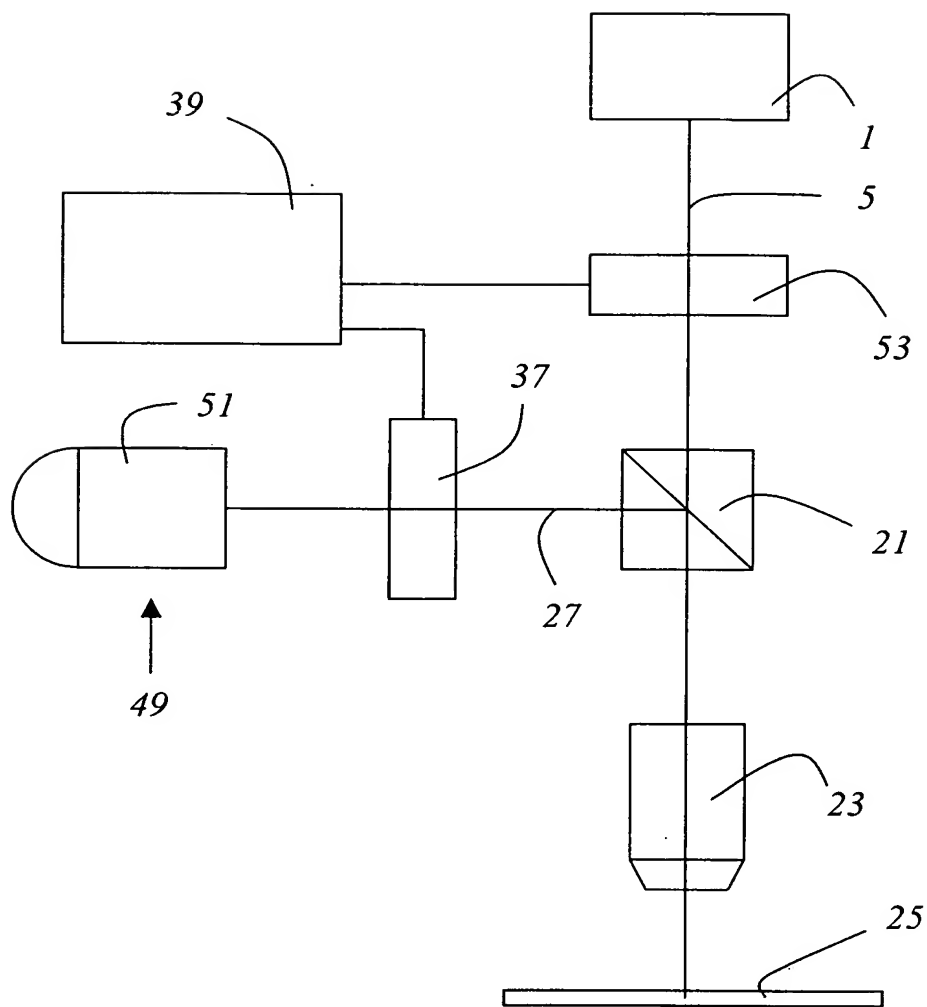


Fig. 3